

- 37 Carroll M K, Bright F V, Hieftje G M. Anal Chem, 1989, 61: 1766~ 1772
- 38 Akihiko Ishida, Emiko Kaneko, Takao Yotsuyanagi Chemistry Letters, 1999: 217~ 218
- 39 Vilchez J L, Navalón A, Avidad R, García-López T, Capitán-Vallvey L F. Analyst, 1993, 118: 303~ 307
- 40 Fernandez M R, Liu Y M, García M E D, Sanz M edel A. Analytica Chimica Acta, 1990, 238: 297~ 305
- 41 Plankey B J, Patterson H H., Cronan C S. Analytica Chimica Acta, 1995, 300: 227~ 236
- 42 李志良 分析化学, 1990, 18(8): 780~ 782
- 43 李建中, 章竹君 化学学报, 1994, 52: 1022~ 1027
- 44 甘宁, 毕树平, 邹公伟 分析化学, 2000, 28(4): 461~ 465
- 收稿日期: 2003- 6- 27

Advances of fluorescence spectrometry in determination of trace aluminum in environment Wang Ping^{1, 2}, Chen Xiaodong¹ (1. Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210093; 2. Department of Chemical Engineering, Nanjing Forest University, Nanjing, 210037)

The recent advances of fluorescence spectrometry in the determination of trace aluminum in environment is reviewed and the trends of development are discussed briefly.

MALDI-TOF 质谱技术分析细胞与组织多肽组成的研究进展

朱金勇 黄河清

(厦门大学生命科学学院分析测试中心, 厦门, 361005)

摘 要 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)具有高通量和高灵敏度的特点, 适合分析超微量蛋白质、肽、多糖和核酸。本文综述近年来采用MALDI-TOF 质谱技术分析中枢神经系统单个细胞或组织内超微量多肽和翻译后修饰多肽组成方面的研究进展, 说明该技术能更直接和真实地揭示生物体内所进行的生化反应途径和信号传导机理。

关键词 MALDI-TOF 质谱技术 细胞 组织 多肽 直接分析

1 前言

真实和准确地阐明各种生物体内, 包括单细胞生物体内的生物化学反应机理, 是生命科学研究工作的目标之一。绝大多数生物体内的蛋白质等生物大分子组分, 不仅量少而且分离相当困难, 使许多研究工作因分离和分析技术的限制而受阻。因而近 10 几年来发展痕量和超微量分析技术成为生命科学领域中最有挑战性和前瞻性课题之一。

基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)是一种脉冲式软电离技术。经电离的样品从离子源转送到质量分析器

内进行分析, 得到其分子量。由于MALDI离子源产生的离子常用飞行时间(time of flight, TOF)质量分析器来分离, 所以MALDI常与TOF连在一起使用, 称为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。MALDI-TOF-MS的优点是, 能耐受较高浓度缓冲溶液、盐和其它非挥发性成分以及去垢剂的存在; 质荷比值与多肽和蛋白质的分子量成对应的关系; 灵敏度高和质量检测范围宽, 新型MALDI-TOF-MS的检测灵敏度可高达 fmol (10^{-15}mol), 质量范围可达 400 kDa 以上; 测定速度快, 可对混合样品直接分析; 仪器构造相对简单, 操作较容易等, 因此是一种非常适合生物活性物

作者简介: 朱金勇, 男, 1979 年月出生, 硕士, 研究方向: 生物质谱与蛋白质组学。

联系人: 黄河清, 教授, 博导。Tel: 0592- 2183255, E-mail: hquang@jingxian.xmu.edu.cn

质快速、大规模、高通量筛选的大型分析仪器。为了提高MALDI-TOF-MS的分辨率和获得更多生物大分子的结构信息,近年来,国际上的生物质谱仪器生产厂家,对离子源、检测器等不断进行改进,发展了各种新技术,例如,离子反射器(ion mirror 或 reflectron)、延迟提取(delayed ion extraction, DE)、快速数字转化器(fast digitizers)源后裂解(post source decay, PSD)和源内碰撞诱导解离(collision-induced-dissociation, CID)等分析技术,使MALDI-TOF-MS的分辨率和准确度大大改善,可达到20000(M/ Δ M)以上和 10^{-6} 数量级。本文侧重综述近年来采用MALDI-TOF质谱技术直接分析中枢神经单个细胞或小块组织中超微量蛋白质、多肽和翻译后修饰多肽组成的研究进展。实际应用表明,MALDI-TOF质谱技术能更直接和真实地揭示中枢神经系统中生化反应的机理与途径。

2 样品制备与分析技术

在MALDI-TOF-MS实验过程中,样品制备格外重要。由于基质辅助解吸生物大分子电离的机理尚不完全清楚,故目前基质的正确选择主要还是凭经验。在样品制备过程中,样品与基质是否能形成共结晶,是决定能否获得一张高质量质谱图的关键因素。此外,在样品量或浓度极低的情况下,只要样品与基质能形成良好的晶型,通过仪器的信号累加功能,同样可获得一张高分辨率和高质量的质谱图,这是其它分析仪器无法做到的。尽管MALDI-TOF质谱技术可以耐受一定的杂质和盐类物质,但如果样品中含有表面活性剂或其它难溶性盐,则很难产生好的结晶,因而也无法显示出高质量的质谱图。另外,如果样品与基体混合比例不恰当,所获得的图谱也会失真。混合液滴干燥法是目前比较普遍采用的样品制备技术,但所获得的晶体颗粒比较大,在样品靶上分布呈不均匀状态,造成背景信号较高,样品信噪比弱。采用重结晶方法可使晶体颗粒变细,分布趋于均匀,可获得较理想的结果。通常分子量大的蛋白质所显示的质谱图,其信噪比和分辨率往往不太理想。采用薄层干燥法或薄层夹心法点样,可使样品和基质形成的晶体更趋均匀,有利于样品的解吸和电离,改善样品质谱峰的信噪比和分辨率,显著提高检测灵敏度。

目前,对不同类型的样品已发展和建立了不同

的实验技术^[1],例如,适合于细菌和人乳腺癌细胞的溶胞产物分析方法和组织有机膜印迹技术等。基质可以直接滴加在新鲜组织上,也可以采取电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)方式直接把基质喷射在组织切片上,或将样品吸附在硝酸纤维素膜上,然后再进行质谱分析,测定的准确度和重现性没有明显降低,检测极限可达1pmol^[2]。在直接分析中枢神经元多肽组成和结构信息过程中,当分子量在500~800范围内时,受磷脂和基质的影响,尤其磷脂的异质性,磷脂峰可覆盖质荷比(m/z)500~800的范围,使确定多肽质谱峰产生困难^[3]。此时,如果在解剖时,小心去除神经鞘,并调整合适的激光能量和位置,仍然可以获得较高质量的质谱图。

Garden等^[4]发展了一种简单的脱盐方法,其中2,5-二羟基苯甲酸(DHB)不仅作为激光解吸生物大分子的基质,而且作为细胞漂洗试剂,通过逐点吸附的方式,把细胞转移到预先已经加入新鲜基质的样品盘上,使细胞内外的盐分被脱去。另一种简化的方法是,在解剖神经元时,用生理盐水代替DHB基质,使脱盐与神经元分离同时进行。采用这种样品处理技术,发现了海兔神经元产卵激素(egg laying hormone, ELH)在leu-leu处断裂的异常加工方式^[5]。

大量实验结果发现,样品检测灵敏度会受基质与杂质产生的化学噪声的影响。实际上,MALDI作为离子源,其背景噪声峰几乎涉及每一个m/z值。待测离子信号强度与背景噪声相仿时,二者几乎无法分辨,除非采用特殊方法提高信噪比,如增加累加时间和次数等。Caprioli^[6]使用MALDI离子阱(ion trap)质谱仪对化学噪声形成机理进行了研究,并就如何降低背景噪声、提高信噪比,如何选择基质和样品靶材料以及离子预活化能等方面提出了一些有益的看法。硅基质上的解吸电离^[7]是近期发展的一种适合应用于MALDI-TOF质谱分析的技术。它是将待测物固定在多孔硅表面,用激光照射,使样品分子汽化并电离,这种无需基质的技术,可测定低分子量样品,并摆脱基质样品峰的干扰,大大拓展MALDI-TOF质谱技术在低分子量范围的应用,例如在单细胞内同时检测神经递质和神经调节肽。

最近,Brandon等人^[8]报道了一种MALDI-TOF-MS的改进技术,MALDI-M-TOF质谱技术,它是在TOF质量分析之前引入M(离子趟

度, ion mobility) 技术, 以提高分离蛋白质混合物的分辨率, 并涵盖更大的酶解片段和氨基酸组成的测量范围。如果进一步将 M-TOF 与 SD (表面诱导解离, surface-induced dissociation) 结合起来, 则可在得到肽质量图谱的同时, 解析出一级信息。而且, M-TOF-MS 与其他技术具有良好的兼容性。例如, M 分离过程可在低压 (1.333kPa) 下进行, 这样 M 到质谱高真空区域的接口更容易实现。M 的快速分离能力与 TOF 质量分析器的数据产生速度也具很好的兼容性。在检测器方面, 正在尝试使用一种低温微粒检测器 (cryogenic particle detectors), 它能克服微通道板检测器 (microchannel plate, MCP) 在检测高分子量生物大分子方面的不足, 对 750 kDa 的大分子仍有较高灵敏度^[9]。

随着蛋白质组研究的深入和拓展, 传统的人工点样方法已不能满足研究的需要, 一种高度自动化处理蛋白质组的技术将替代传统的技术。Tasso 等人发展了一种液相处理压电技术, 可在特定的靶上快速精确地沉积皮升级样品, 在极微量水平上高速鉴定蛋白质样品, 比传统方法提高灵敏度 10~50 倍。该技术与镀膜靶技术 (基质与硝酸纤维素膜混合, 在靶上均匀镀一层薄膜) 结合使用时, 可以使样品点尽量缩小, 从而极大地提高样品浓度, 使肽信号大幅增强, 提高了 MALDI-TOF/MS 的检测灵敏度^[10]。

3 细胞内多肽组成分析

目前 MALDI-TOF 质谱技术已具备分析复杂和超微量混合样品多肽及蛋白质的能力, 能直接研究细胞中基因表达的多肽产物、磷酸化产物和包涵体去折叠及折叠过程等一系列细胞内基因表达产物加工过程, 并且能在细胞或组织水平上直接分析微量蛋白质、多肽和它们的一级结构信息 (相对误差仅为 0.01%~0.1%)。许多研究工作者已经直接采用 MALDI-TOF 质谱技术进行组织或组织切片、完整细胞的蛋白全质谱图分析。首例用 MALDI 质谱技术研究单细胞的报道是 Vanveelen 等人^[11]对 *Lymnaea stagnalis* 神经元进行的研究。此后, 越来越多的研究者开始将 MALDI 质谱技术应用于细胞与组织多肽的研究, 取得了一系列重要成果。Veelen 等人^[12]在采用 MALDI 质谱技术研究单个神经元多肽过程中, 发现了产卵激素原 (egg laying

prohormone) 来源的一组复杂的肽, 除已知的肽外, 还检测到了两种新肽。类似的研究还发现了浅黄细胞 (light-yellow cells, LYC) 肽激素原新的剪接产物。Worster 等人采用 MALDI 质谱技术研究了 *Lymnaea* 单个神经元中 FMRFamide 基因的 mRNA 选择性剪接表达模式, 证实了该基因转录产物编码的不同肽段存在相互排斥性表达。Li 等人^[13]用实验证明, 侧腹神经连索 (pleural abdominal connective, PAC) 中 ELH 和酸性多肽 (acidic peptide, AP) 可以从袋细胞 (bag cell) 输送到脑神经节, 这些多肽可能参与神经信号传导和执行新生理功能。Klaus 等人^[13]采用 MALDI 质谱技术对 *Lymnaea stagnalis* 阴茎神经进行详细研究, 发现该神经中含有大量复杂的肽, 其中有两种未见报道, 分子量与已知的单细胞蛋白 (single cell protein, SCP) A 和 B 相似。在中枢神经伸入阴茎的轴突处也发现了这两种肽。将 MALDI 质谱技术用于研究蛙 *xenopus laevis* 垂体中叶 melanotrope 细胞中鸦片样肽促黑素促皮质素原 (pro-opiomelanocortin, POMC) 的加工产物, 展示了 POMC 加工产物的全貌^[14]。MALDI 质谱技术研究单细胞多取材于软体动物神经元, 其尺寸一般大于 500 μ m, 也包括直径在 10~30 μ m 范围内的细胞。近期, Rubakhin 等^[15]将 MALDI 质谱技术应用于鉴定海兔突触小泡 (直径仅 0.8~2.0 μ m) 内的多肽组分, 发现在每个小泡内含有至少由 4 个基因所表达的 10 种多肽。Floyd 等^[16]将 MALDI-TOF 质谱仪与微孔液相色谱仪 (microbore liquid chromatograph) 联用, 利用 MALDI 确认并指导肽的纯化过程, 并获得较好的分离效果。

此外, MALDI 质谱技术还可以用于菌种的快速鉴定, 在鉴定致病菌、环境污染监测和鉴别生物武器等方面将起重要作用。电喷雾质谱技术 (ESI-MS) 需要对待分析细胞进行溶解, 而 MALDI 质谱技术则可直接进行分析。传统方法鉴定结核杆菌属中的分支杆菌需要数周时间, 而应用 MALDI 质谱技术则在数分钟或稍长的时间内即可完成。把待分析细菌快速从培养基中移出, 并与基质溶液混合, 随后进行 MALDI 质谱测定, 通过叠加对比分析技术, 可迅速鉴定靶细菌种类^[17]。

4 细胞内多肽一级结构直接分析

随着基于 MALDI 质谱的测序技术不断完善,

在无需预分离的条件下, 已可直接从细胞样品中获得部分或完整的多肽一级结构信息。Perry 等人^[18]证明了使用MALDI-PSD 对神经切片进行多肽测序的可行性, 在 *Lymnaea* 的一小片神经组织上, 可直接进行两种心脏活性小肽 (small cardioactive peptides, SCP) A 和 B 的测序工作。MALDI-PSD 也可直接分析细胞溶胞产物的一级结构。Li 等人^[19]发展了一种双基质样品制备方法, 采取MALDI-PSD 技术首次完成了单个神经元内完整多肽的测序工作。然而, 在多肽分子量大于 2000 Da、结构复杂化、单个多肽质谱峰无法分辨或者特定肽无法获得足够碎片离子质谱峰条件下, MALDI-PSD 质谱测序技术仍受到很大限制。目前, 已发明了一些辅助技术来弥补MALDI-PSD 技术的不足。例如, MALDI-TOF 与四极杆分析器 (quadrupole analyzer) 结合形成的 Q-TOF (quadrupole time-of-flight) 质谱仪, 是一种具有高电离效率的MALDI源和多选择性的质量分析器。Q-TOF 由 Q1、Q2 和 Q3 组成。Q1 对母离子表现出高选择性; Q2 是高能碰撞室, 用以实现离子的高效碎片化; Q3 是 TOF 质量分析器, 能对碎片离子进行高灵敏度检测。

5 肽翻译后修饰分析鉴定

多肽或蛋白质经翻译后修饰, 会引起质量数变化, 这种变化的差值处于常规分析方法误差范围内, 因而增加了分析工作的难度。MALDI质谱因具有高灵敏度的特点, 借助酶催化专一性修饰基团, 测定酶反应前后多肽或蛋白质质量变化的差值, 就比较容易判断被修饰的位点和结构。例如, 对海兔 R3-14 神经元进行单细胞MALDI分析, 发现存在焦谷氨酸 (pGlu) 化肽, 通过用焦谷氨酸氨肽酶处理 R3-14 神经元得到证实。Vilim 等人^[20]用MALDI检测大脑神经肽 2 (cerebral peptide 2, CP2) 前体来源的活性肽, 通过检测神经元合成 CP2 的精确分子量并与已知肽的质量数进行对比, 阐明了 CP2 前体的整个加工过程, 并发现 CP2 前体能产生非 CP2 肽。

近年来, 随着MALDI-PSD 技术不断更新和发展, 在完善多肽碎片一级结构测序过程中, 可鉴别众多多肽修饰位点。例如, 在 $(M+H-80)^+$ 处碎片离子信号是由于缺失 HPO₃, 磷酸化肽中丢失 (HPO₃+H₂O), 也可产生 $(M+H-98)^+$ 。其他如二

硫键、糖基化、酰胺化、乙酰化等都可用MALDI-PSD 进行鉴定。

6 肽与肽之间的相互作用

多肽之间可通过非共价方式形成非共价复合物 (NCX), 这方面的研究亦是近年来多肽结构与功能研究的热点。由于多肽复合物在气相中稳定性较好, 因而常用电喷雾电离 (ESI) 质谱研究这些多肽的质谱特性。但是, NCX 的存在会产生干扰并抑制 ESI 的喷雾效率, 所以MALDI更适合用于多肽复合物的电离。目前用MALDI技术已成功分析了多种非共价复合物, 并可用于观察NCX 的形成, 如酸性肽与碱性肽之间盐桥的形成。Woods 等人^[21]建立了 dynorphin-met-enkephalin 复合物模型, 证明MALDI技术在这一研究领域具有特殊的优越性。黄河清等^[22]在使用MALDI-TOF 质谱技术研究电泳纯鳊鱼肝铁蛋白 (liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF) 的电荷分布时发现, 由 20 个亚基组成的DALF 蛋白壳表层显示出三种不同质荷比的分子离子峰, 从而建立了DALF 蛋白壳表面高密度正电荷分布模型, 更合理地阐明了DALF 从铂电极上直接接受电子的机理和电子隧道的结构与组成。Hummon 和黄河清^[23]采用有机溶剂萃取和MALDI-TOF 质谱技术, 研究海兔口腔神经节中超微量酸性多肽酶分解酸性多肽 Leu-leu 的动力学全过程, 建立了直接分析神经组织中超微量多肽酶活性的新颖技术。

7 细胞与组织中多肽的半定量分析

尽管MALDI-TOF 质谱技术能为研究细胞内多肽组成提供其他技术无法完成的结果和结构信息, 但与其它分析技术相比, 因MALDI-TOF 质谱峰的强度依赖于肽的特性、基质与样品制备方法、是否有污染 (如盐、去污剂和变性剂) 等众多因素, 所以定量分析较为困难。但是, 在特定生理条件下, 采用MALDI-TOF 质谱技术作半定量分析进行多肽调控的研究还是可行的。例如, Van Strien 等^[14]研究了动物促黑素细胞在不同光照条件下肽量的差异。另外, Jiménez 等发展了一种用肽差异显示法检测大鼠神经中叶 (neurointermediate lobe, NIL) 内多肽的方法, 结果表明, 在不同盐浓度变化条件下 (subjected to salt loading) 存在半定量的变化。Garden 等人^[5]使用单细胞比例法 (single-cell ratio

approach), 通过比较质谱峰与已知肽峰强度的比例, 对海兔袋细胞(bag cell)神经元内多肽进行半定量测定。

MALDI 质谱技术与其他分析技术相比, 具有高灵敏度、高通量且无需预处理即可直接分析生物样品多肽组成等一系列优越性。随着基于MALDI 的测序技术的发展, MALDI 质谱技术已经从简单的分子量测定方法, 发展成为发现新肽并可迅速测定其结构的一种十分优秀的实验手段, 其研究成果必将大大丰富基因组学、蛋白质组学的研究。

参考文献

- Kusmann M, Nordhoff E, Rahbek N K et al J Mass Spectrom, 1997, 32 (6) : 593- 601
- 魏开华, 杨松成, 钱小红等 质谱学报, 1999, 20 (2) : 37-42
- Li L J, Moroz T P, Grden R W et al Peptides, 1998, 19(8): 1425- 1433
- Garden R W, Moroz L L, Moroz T P et al J Mass Spectrom, 1996, 31(10): 1126- 1130
- Garden R W, Shippy S A, Li L J et al Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3972- 3977
- Caprioli R M, Farmer T B, Gile J. Anal Chem, 1997, 69(23): 4751 - 4760
- Wei J, Buriak J M, Siuzdak G et al Nature, 1999, 399 (6733): 243 - 246
- Ruotolo B T, Gillig K J, Stone E G et al Inter J Mass Spectrom, 2002, 219(1): 253- 267
- Hilton G C. Nature, 1998, 391: 672- 675
- Miliotis T, Nilsson J, Laurell T et al J Neurosci Methods, 2001, 109(1): 41-46
- Vanveelen P A, Jimenez C R, Li K W et al Org Mass Spectrom, 1993, 28(12): 1542- 1546
- Li K W, Jimenez C R, Veelen P V et al Endocrinology, 1994, 134(4): 1812- 1819
- Klaus D, Robert K, Wijand P M G et al. Inter J Mass Spectrom and Ion Processes, 1997, 169/170 : 291- 299
- Strien V F J, Jespersen S, Jenks B G et al FEBS Lett 1996, 379(2): 165- 170
- Rubakhin S S, Garden R W, Fuller R R et al Nature Biotechnology, 2000, 18(2): 172- 175
- Floyd P D, Li L J, Moroz T P et al J Chromatogr A, 1999, 830 (1): 105- 113
- Baar B L V. FEM S Microbiology Review s, 2000, 24 (2): 193- 219
- Perry S J, Dobbins A C, Schofield M G et al Eur J Neurosci, 1999, 11(2): 655- 662
- Li L, Garden R W, Romanova E V et al Anal Chem, 1999, 71(24): 5451- 5458
- Vilm F S, Alexeeva V, Moroz Z Z et al Peptides, 2001, 22(12): 2027- 2038
- Woods A S, Koomen J M, Ruotolo B T et al J Am Soc Mass Spectrom, 2002, 13(2): 166- 169
- 黄河清, 孔波, 林庆梅等 生物物理学报, 2002, 18(1): 99- 103
- Huammon A B, Huang H Q, Kelly W P et al J Neurochem, 2002, 82(6): 1398- 1405

收稿日期: 2003- 07- 02

Progress of research on analysis of peptide components in cell and tissue with MALDI-TOF mass spectrometry. Zhu Jinyong, Huang Heqing (The Center for Analysis and Testing, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

The matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has advantages of high throughput and high sensitivity. It is suitable for analysis of ultramicro proteins, peptides, polysaccharides and nuclear acids. This paper describes the recent development of research on the direct analysis by MALDI-TOF-MS of ultramicro peptides and their translated and modified forms in single cell or tissue of central nervous system. The MALDI-TOF mass spectrometry can disclose the mechanisms of biochemical reactions and signal transmission in organism more directly and truly.

· 报摘 ·

我国应大力发展科学仪器产业

目前, 我国大型工程项目的核心仪器全部依靠进口。全国各类科研经费有一半左右用来购置进口仪器。研究所、高校、以及国家、地方重点实验室所用的科学仪器, 不论是材料制造设备还是测量仪器大部分都是进口的。针对这种现状, 储君浩等 8 位全国人大代表建议: 应把发展仪器仪表作为国家大事, 制定全方位的规划, 发挥国家、地方、行业、研究所、高校和企业的积极性。在科技部设立科技设备设施和仪器仪表建设办公室, 设立重要基础研究和设施建设专项计划, 设立科学仪器仪表创新研制专项计划, 增加国家自然科学基金会科学仪器基础研究专项的投入比例。在机制上, 国家科研机构要与地方结合, 研究所、高校要与企业结合, 部门之间、地方之间、军民之间都要结合互动, 建立有效的发展和管理模式, 包括组织方式、发展定位、目标和重点、投入强度和方式、评审标准、项目验收等。

摘自 2004 年 4 月 8 日《中国工业报》